Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof.Dr.med.Bernhard S c h m i d t

Elektrochemische Blutmessungen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität
Berlin

vorgelegt von
T e i c h m a n n , Horst
aus Berlin

1961

Druck:

Ernst - Reuter - Gesellschaft
der Förderer und Freunde der Freien Universität e.V.

Dissertations - Druckstelle

Berlin-Dahlem, Garystr. 45, Tel.: 76 52 61, App. 668

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof.Dr.med.Bernhard S c h m i d t

Elektrochemische Blutmessungen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität
Berlin

vorgelegt von
T e i c h m a n n , Horst
aus Berlin

Dekan: Professor Dr.med.Helmut S e l b a c h
Referent: Professor Dr.med.Bernhard S c h m i d t
Korreferent : Professor Dr.med.Dr.h.c. Max-Heinrich F i s c h e r

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am 27.März 1961

A. Einleitung

Seit einigen Jahren haben Konzentrationsmessungen oxydierender und reduzierender Stoffe durch galvanische Modellelemente in die verschiedensten Gebiete der Technik und Biologie Eingang gefunden. In letzter Zeit fand die von F. TÖDT entwickelte Methode auch Anwendung bei rein medizinischen Fragestellungen. Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, mittels der elektrochemischen Meßmethode die Katalaseaktivität im Blut Gesunder und Krebskranker zu messen sowie die Methylenblauatmung der Erythrocyten zu bestimmen.

Das Prinzip der elektrochemischen Sauerstoffmessung beruht auf der Tatsache, daß die Stromdichte geeignet zusammengestellter galvanischer Elemente unter bestimmten Versuchsbedingungen als exaktes Maß für den im Elektrolyten gelösten Sauerstoff verwendet werden kann (1). Gegenüber der chemischen Sauerstoffbestimmung sind die Einfachheit und Schnelligkeit sowie die zeitlich lückenlose Erfassung von Sauerstoffkonzentrationsänderungen bemerkenswert. Es handelt sich dabei um die Feststellung eines Grenzstromes, bei welchem die Diffusion des Sauerstoffes an die edlere Elektrode als langsamster Vorgang geschwindigkeitsbestimmend ist. Daher hängt die Stromstärke nur von der Sauerstoffdiffusion ab. Eine konstante Diffusionsgeschwindigkeit ist daher die erste Voraussetzung für eine quantitative

und reproduzierbare elektrochemische Sauerstoffmessung. Die Stromlieferung galvanischer Elemente ist dann für quantitative Sauerstoff-Bestimmungen verwendbar, wenn der einzig stromliefernde Vorgang die Reduktion des gelösten Sauerstoffs an der edleren Elektrode ist. Diese kathodische Sauerstoffreduktion wird in der Elektrochemie als Depolarisation bezeichnet. Wichtig für die Praxis ist die exakte und reproduzierbare Beziehung zwischen der kathodischen Sauerstoffreduktion und der gemessenen Stromstärke.
Entsprechend diesen Vorgängen ist die Messung reduzierender Substanzen, wie zum Beispiel H_2O_2, H_2 und Ascorbinsäure, möglich. Der bei einer anodischen Oxydation sich bildende Grenzstrom (Diffusionsgrenzstrom) ist in gleicher Weise meßbar (2).

Nach dem beschriebenen Prinzip sind in Abschnitt B Messungen der Katalaseaktivität und in Abschnitt C Bestimmungen der Methylenblaukatalyse durchgeführt worden.

B. Messung der Katalaseaktivität im Blut Gesunder und Krebskranker

I. Anregung zu eigenen Untersuchungen

In einer Arbeit von DAMASCHKE und TÖDT (3), die sich mit der elektrochemischen H_2O_2-Messung zur Bestimmung des katalysierten Zerfalls von H_2O_2 durch Blutkatalase befaßt, werden Versuche an Gesunden und Carcinomträgern durchgeführt. Es wird festgestellt, daß zwischen dem Blut Gesunder und dem Krebskranker deutliche Unterschiede in der Katalaseaktivität bestehen und daß darüber hinaus aus dem Maß der Senkung der Katalaseaktivität Aussagen über die Schwere der Erkrankung gemacht werden können. Aufgabe des ersten Teils dieser Arbeit ist es, diese Feststellungen an einem größeren Patientenmaterial zu überprüfen. Zunächst jedoch werden einige Angaben aus dem Schrifttum dargelegt.

II. Geschichtliches

Seit einigen Jahrzehnten wird ein Zusammenhang zwischen der Katalaseaktivität und bösartigen Geschwulsterkrankungen diskutiert. Im Jahre 1910 beschrieben BLUMENTHAL und BRAHM erstmalig das Vorkommen eines katalasehemmenden Faktors in Tumoren (4). Es gelang HARGREAVES und DEUTSCH, einen solchen Faktor in vitro darzustellen,

während GREENSTEIN durch in vivo-Versuche die Bestätigung dafür geben konnte (5). Mit dem Problem eines solchen Hemmstoffes beschäftigten sich auch NAKAHARA und FUKUOKA, die diesen Stoff Toxohormon nannten (6). Dieser Begriff erscheint auch noch in neuerer Zeit. FRISCH-NIGGEMEYER und HÖLLER beschreiben durchgeführte Parabioseversuche, durch die festgestellt wird, daß Toxohormon in den Blutkreislauf gelangt, ohne allerdings besonderen Einfluß auf die Erythrocytenkatalase zu nehmen (7, 8).

Weiterhin beschreiben HIRSCH und PFÜTZER die Ultrafiltrierbarkeit des Katalasehemmfaktors aus EHRLICHschem Mäuseascitestumor und weisen die katalasehemmende Fraktion mit dem in vitro-Versuch nach HARGREAVES und DEUTSCH nach. Neben der Katalase werden selbstverständlich auch andere Fermentsysteme durch Tumorwachstum geschädigt bzw. gehemmt. So berichten beispielsweise EULER, AHLSTRÖM, RÖNNESTAMM und PETTERSSON (9) über die Zunahme der Brenztraubensäurekonzentration im Tumorblut in Zusammenhang mit den entsprechenden Enzymaktivitäten und deren Verminderung bei Geschwulstträgern.

Nach EULER wird die Senkung der Katalaseaktivität erstens durch Abnahme der Katalasemenge und zweitens durch Beeinflussung verschiedener Aktivatoren und Inhibitoren verursacht (10).

Ob die Senkung der Katalaseaktivität durch tumorbedingte Hemmstoffe spezifisch ist, muß angezweifelt

werden. Immerhin muß festgestellt werden, daß schnelles Gewebswachstum allein keine Hemmung der Katalaseaktivität hervorruft. Der Effekt tritt zum Beispiel bei rasch wachsenden implantierten Embryonalgeweben und bei Regeneration teilweise ausgeschnittener Leber nicht auf (11).

GREENSTEIN, JENRETTE und WHITE berichten sogar über spontane Rückkehr der Katalaseaktivität nach totalexstirpiertem Tumor (12). In diese Richtung weist auch eine Feststellung von HADDOW, der eine Parallelität zwischen Abnahme der Katalasewirkung und dem Wachsen eines Tumors beschreibt (13).

Zu einer gegenteiligen Ansicht gelangen APPLEMAN (14), der bei proteinverarmten Ratten im Hungerstoffwechsel, und DUTCHER, COLLATZ (15), DRAGANESCO (16), die bei polyneuritischen B_1-Avitaminosen Katalasehemmung feststellten. Solange es im Hungerstoffwechsel nicht zur Einschmelzung von Körpereiweiß kommt, wird eine Katalasehemmung ebensowenig gefunden wie bei Infektionen mit Poliomyelitis-Virus, Staphylokokken oder Streptokokken.

Der größte Teil der Untersuchungen wurde von den vorgenannten Autoren mit Leberkatalase durchgeführt. Die Leber gilt als Hauptbildungsort für die Katalase, und man glaubte hier einen Effekt am leichtesten nachweisen zu können. BRAHM und GREENSTEIN (7) fanden einen kata-

lasehemmenden Faktor erst bei Tumoren, die mindestens 5 % des Körpergewichtes ausmachten und sich durch rasches Wachstum auszeichneten.

Einen bedeutend höheren Gehalt an Katalase als die normale Körperzelle haben die Blutzellen. Es liegt also nahe, Messungen der Katalaseaktivität im Blut vorzunehmen. Eine Trennung in einzelne Fraktionen erscheint überflüssig, da der weitaus größte Katalaseanteil in den Erythrocyten zu suchen ist, wenn auch die in geringerer Zahl vorliegenden Leukocyten eine höhere Konzentration enthalten.

PAPADODOULOU (17) fand bei Blutmessungen nach dem titrimetrischen Permanganatverfahren nach EULER und JOSEPHSON (18), daß deutliche Unterschiede in der Katalaseaktivität zwischen gesunden und krebskranken Versuchspersonen bestehen. Verfasserin stellt eine Unabhängigkeit von der Zahl der Erythrocyten und ihrem Hämoglobingehalt fest, glaubt jedoch eine Beeinflussung durch hormonale Faktoren festgestellt zu haben, was an dem Beispiel einer Schilddrüsenüberfunktion aufgezeigt wird. Das benutzte Meßverfahren scheint aber nur schwer genaue Werte zu liefern, weshalb BURGE (19), der ebenfalls titrimetrisch arbeitete, eine Wiederholung der Untersuchungen mit einer modernen Methode empfahl, um bindende Aussagen machen zu können.

Aus diesem Grunde erschien es von prinzipiellem Interesse festzustellen, welche Ergebnisse sich in dieser Frage mit der TÖDTschen Methode erzielen lassen. Nach der elektrochemischen Methode wird die Katalaseaktivität durch H_2O_2-Messung bestimmt. Die Untersuchungen werden folgendermaßen durchgeführt:

III. Eigene Untersuchungen

1. Methodik

Man entnimmt mit Hilfe vorgewärmter Spritzen von Versuchspersonen, die nüchtern sind und seit mindestens 12 Stunden keinerlei Pharmaka bekommen haben, eine Blutprobe. Das Blut wird mit Vetren ungerinnbar gemacht und in ein vorgewärmtes Gefäß gegeben, welches in einem Thermostaten bei 37 ° Celsius konstanter Temperatur aufgehoben wird.

Eine bereits auf 37 ° angewärmte Pufferlösung (7,5 g $Na_2 HPO_4 - H_2O$ und 1,8 g $KH_2 PO_4$ pro Liter aqua dest.) wird in ein Elektrodengefäß von 160 ml Inhalt, dieses selbst in ein Wasserbad von 37 ° gebracht. Um bei den nun folgenden Zusätzen einen schnellen Konzentrationsausgleich zu erzielen, wird ein Magnetrührer mit 800 Umdrehungen pro Minute in Tätigkeit gesetzt. Nach Einstellung der Temperaturkonstanz werden 1,5 ml H_2O_2, das heißt 0,8 mal 10^{-3} Mol/Liter (1 ml Perhydrol,

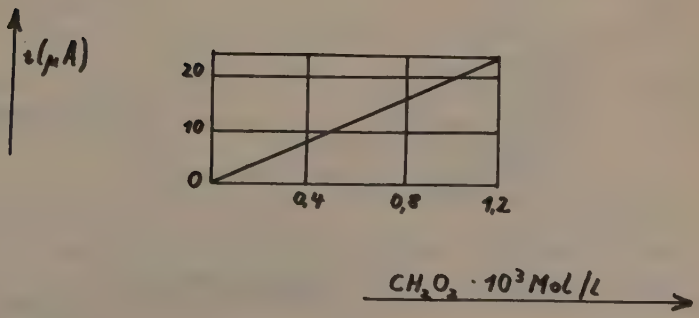
Aqua bidestillata ad 100 ml) zugesetzt. Nun werden in das Elektrodengefäß 1,25 ml des 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Blutes gegeben. Der im Blut vorhandene Katalasegehalt bewirkt die Zersetzung der vorher zugefügten H_2O_2. Bei der anodischen Oxydation von H_2O_2 an platiniertem Pt, die nach der Bruttoreaktion $H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2\,H^+ + 2\,\bar{}$ abläuft, bildet sich ein anodischer Diffusionsgrenzstrom. Mit Hilfe eines Ampèremeters und einer Stoppuhr wird die Halbwertszeit des H_2O_2-Zerfalls gemessen, aus der sich die Reaktionszeitgeschwindigkeitskonstante = RGK ergibt.

DAMASCHKE gelangte dabei zu der Feststellung, daß unbelüftetes Blut über längere Zeit den gleichen RGK-Wert, belüftetes Blut dagegen immer den 10fachen RGK-Wert ergibt. Das Blut gesunder Versuchspersonen erreicht diesen RGK-Wert bereits nach einer Belüftungszeit von 3 - 5 Minuten, während bei dem Blut kranker Versuchspersonen wesentlich längere Belüftungszeiten notwendig werden. Die Belüftung wurde durchgeführt, indem mit Hilfe einer Aquarienluftpumpe und eines Rotameters konstant 3,5 Liter Luft pro Stunde durch eine Blutkapillare in einen 25 ml Glaszylinder mit der Blut-Kochsalz-Verdünnung geleitet wurden. Der Endpunkt der Belüftung ist erreicht, wenn das Blut klar wird, d.h. Hämolyse eintritt.

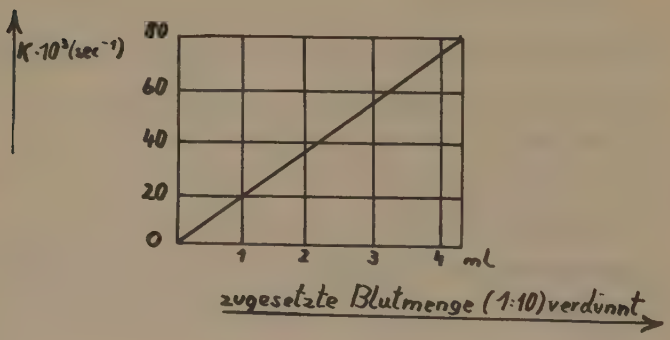
Die gesamte Katalase, die vorher an die Erythrocyten gebunden war, ist nun frei, und der RGK-Wert kann nicht weiter ansteigen. Die von DAMASCHKE gefundene höhere Belüftungszeit beim Blut Krebskranker entspricht dabei einer erhöhten Resistenz der Erythrocyten gegen Hämolyse, wie sie von MITROVITCH und KÜNSTLER (20, 21) im Blut Krebs- und Gallenkranker gefunden wurde.

Die Durchführung der Versuche erfolgte unter den von DAMASCHKE und WINKELMANN (2) erarbeiteten Voraussetzungen.

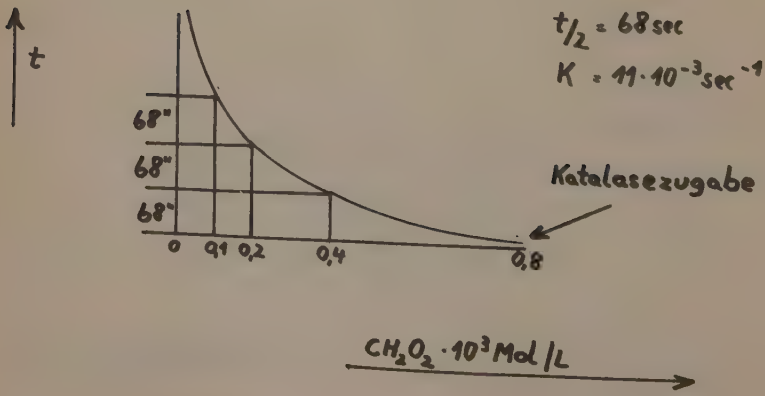
1) Eine für das Elektrodenpaar Platin gegen $Hg/Hg_2\ SO_4$ aufgestellte Eichkurve zeigt, daß bei den benutzten H_2O_2-Konzentrationen Proportionalität zum gemessenen Strom besteht. Damit keine Quecksilberionen in den Elektrolyten geraten, wird die $Hg_2\ SO_4$-Elektrode hinter einem Diaphragma in $Na_2\ SO_4$ gehalten.



2) Es besteht lineare Abhängigkeit zwischen Blutkatalasegehalt und Reaktionsgeschwindigkeit.



3) Die Reaktion ist in Bezug auf H_2O_2 erster Ordnung, und zwar bei kleinen und großen Katalasekonzentrationen. Die Reaktion ist in alkalischen oder sauren Medien nicht mehr 1. Ordnung, sondern wird allmählich immer langsamer. Es ergibt sich ein Temperaturoptimum von 37 ° C und ein pH-Optimum bei 7,5



4) Um vergleichbare Werte zu erhalten, werden Messungen sofort, 2 1/2 und 5 Stunden nach der Blutentnahme durchgeführt.

Bei den von DAMASCHKE durchgeführten Untersuchungen finden sich folgende Ergebnisse:

Gesundes Blut ergibt bei Aufnahme der Meßreihen auch über 5 Stunden hinaus bis zu 24 Stunden nach der Blutentnahme unbelüftet die gleiche Reaktionsgeschwindigkeitskonstante und belüftet immer etwa den 10-fachen Wert. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt KRAINEW (22), der die Aktivität der Blutkatalase des nicht hämolysierten Blutes bestimmt. Dieser 10-fache RGK-Wert wird bei gesundem Blut bereits nach einer Belüftungszeit von 3 - 5 Minuten erreicht und bleibt dann konstant.

Das Blut der untersuchten krebskranken Versuchspersonen verhält sich dagegen anders:

Die RGK-Werte sofort nach der Entnahme (unbelüftet) unterscheiden sich nicht vom Blut Gesunder. 2 1/2 und 5 Stunden nach der Blutentnahme werden jedoch wesentlich höhere Belüftungszeiten zur Erreichung eines konstanten RGK-Wertes notwendig.

Diese Versuche hatten ein so verblüffendes Ergebnis, daß eine größere Reihe von Vergleichsuntersuchungen an gesunden und krebskranken Versuchspersonen durchgeführt werden sollte.

Die Berechtigung zu derartigen Untersuchungen wurde aus den - auch in neuerer Zeit - diskutierten Zusammenhängen hergeleitet.
So findet beispielsweise CASTRILLO (23) eine deutliche Verminderung des Katalasegehaltes in Leukocyten von Carcinomträgern.
HOLMAN (24, 25), der von der Vorstellung eines gestörten Katalase-Peroxyd-Gleichgewichtes bei Carcinomträgern ausgeht, versucht sogar, Ratten durch orale H_2O_2-Gaben von WALKER 256-Tumoren zu befreien, was ihm angeblich in 50 - 60 % der Fälle gelingt und durch Kontrollversuche an unbehandelten Tieren bewiesen werden soll.

2. Versuchspersonen und Versuchsergebnisse

Für die hier beschriebene Untersuchungsmethode wurden folgende Versuchspersonen ausgewählt:

A) 27 klinisch gesunde Personen ohne irgendwelche Besonderheiten in der Anamnese, vorwiegend unter 50 Jahren alt.

B) 31 vorwiegend krebskranke Personen, Alter über 50 Jahre.

Die Diagnose im einzelnen:

Lfd.Nr.		
1	Basaliom (Ulcus rodens)	76 % Hb
2	Rectum-Ca, multiple Lungenmetast.	90

Lfd.Nr.		
3	Blasen-Ca	81 % Hb
4	Vaginal-Ca, infiltr.Parametr.	77
5	Mamma-Ca	82
6	Hautmetastasen nach Mamma Abl.	77
7	Magen-Ca	92
8	Kehlkopf-Ca	80
9	Melanom (Unterschenkel)	82
10	Mamma-Ca	83
11	Mamma-Ca	70
12	Magen-Ca	+)
13	Haut-Ca (Fußsohle, Leistendrüsen)	+)
14	Zungen-Ca, Just. nach totaler Ut.Exst.	95
15	Magen-Ca	70
16	Bronchial-Ca	65
17	Magen-Ca	+)
18	Prostata-Ca	76
19	Lungen-Ca	45
20	Magen-Ca	80
21	Blasen-Ca	
22)	Cervix-Ca	72
23	Genital-Ca	+)
24	Genital-Ca	+)
25	Genital-Ca	+)
26	Magen-Ca	70
27	Oesophagus-Ca	88
28	ausgedehntes Genital-Ca	+)
29	Portio-Ca	71

---- -.--------

+) Hb-Werte nicht bekannt.

Lfd.Nr.

30 Lungentuberkulose

31 Lungentuberkulose

Bei diesen Versuchspersonen wurden durch die elektrochemische Messung

die Halbwertzeiten (t/2)

gefunden, die in den folgenden Tabellen zusammengestellt sind:

K r a n k e

Lfd.Nr.	2 1/2 Std. nach Blutentnahme			5 Std. nach Blutentnahme			
	0	5	10	0	5	10	Belüftungszeit in Minut.
1	148	121	44	192	143	55	
2	130	97	18	132	118	91	
3	169	119	19	184	115	19	
4	185	138	65	208	142	30	
5	154	37	20	140	20	-	
6	186	118	65	186	53	18	
7	160	140	58	207	128	48	
8	163	29	19	167	114	20	
9	168	88	19	169	133	44	
10	194	162	57	201	184	152	
11	246	176	145	242	217	217	
12	212	157	33	200	184	35	
13	224	159	84	180	153	151	
14	214	23	-	155	135	64	

Lfd.Nr.	2 1/2 Std. nach Blutentnahme			5 Std. nach Blutentnahme			
	0	5	10	0	5	10	Belüftungszeit in Minuten
15	130	46	50	199	176	103	
16	228	199	173	235	200	141	
17	226	240	196	241	195	45	
18	283	240	172	292	225	67	
19	308	312	154	281	296	245	
20	238	185	53	216	171	37	
21	205	154	112	213	145	124	
22	228	194	97	225	187	62	
23	184	150	127	199	150	26	
24	199	191	210	206	171	60	
25	192	167	71	223	185	21	
26	142	41	18	246	201	115	
27	222	191	70	217	190	66	
28	176	143	97	180	148	94	
29	232	165	147	244	217	162	
30	227	174	27	210	210	33	
31	213	217	91	216	192	48	
			Gesunde				
1	165	35	20	155	19	-	
2	141	103	25	183	180	34	
3	157	139	14	110	89	15	
4	155	63	19	108	87	22	
5	173	16	-	180	34	29	
6	133	92	23	152	151	16	
7	95	17	-	152	87	18	

Lfd.Nr.	2 1/2 Std. nach Blutentnahme			5 Std. nach Blutentnahme			Belüftungszeit in Minuten
	0	5	10	0	5	10	
8	152	123	69	150	120	50	
9	150	116	69	148	95	19	
10	140	130	72	155	121	27	
11	164	17	-	159	17	-	
12	226	133	32	208	159	28	
13	155	31	16	170	90	74	
14	168	60	13	158	69	17	
15	175	67	18	179	59	22	
16	177	43	18	180	45	18	
17	205	155	34	203	170	25	
18	169	145	127	156	130	42	
19	199	185	69	-	-	-	
20	169	133	22	176	150	82	
21	174	132	64	37	38	-	
22	168	143	100	160	135	91	
23	193	143	46	195	142	50	
24	184	184	161	207	178	32	
25	228	194	97	225	187	62	
26	285	242	101	231	195	44	
27	198	165	115	194	159	70	

Untersucht wurden also:

29 Patienten mit verschiedenen Geschwulstkrankheiten

27 gesunde Versuchspersonen und

3 Patienten mit Lungentuberkulose und hochgradiger Anaemie.

3. Diskussion der Ergebnisse

Die Gegenüberstellung der gefundenen Werte für t/2 zeigt, daß sich deutliche Unterschiede zwischen Gesunden und Kranken nicht feststellen lassen.

Im Durchschnitt liegen die Werte für t/2 für beide Gruppen in etwa der gleichen Höhe und zeigen auch in ihrem Abfall keine deutlichen Unterschiede.

Zunächst ergibt sich, daß die Resistenz der Erythrocyten gegen Hämolyse bei dem Blut Krebskranker nicht eindeutig gesteigert ist.

Folgende statistische Zusammenstellung gibt darüber Auskunft:

Belüftungszeit in Minuten	Kranke		Gesunde		Std.
	2 1/2	5	2 1/2	5	
5	1	1	3	2	
10	6	4	7	5	
15	7	11	9	13	
20	10	6	6	5	
25	2	3	1	-	
30	1	1	-	-	
35	1	1	-	-	

Wenn auch das Blut Krebskranker eine gewisse Tendenz zu länger erforderlichen Belüftungszeiten zeigt, so läßt doch die breite Streuung keine Differenzierung zu. Die meisten Blutproben hämolysieren zwischen 10 und 20 Minuten Belüftungszeit sowohl bei Gesunden wie auch bei kranken Versuchspersonen.

Weiterhin zeigt sich im Abfall von t/2 in Bezug auf den unbelüfteten Anfangswert kein deutlicher Unterschied zwischen gesund und krank.

Vergleicht man in der Tabelle die Werte zwischen klinisch leichter oder schwerer Erkrankten, so lassen sich ebenfalls keine unterschiedlichen Werte finden. Das gleiche gilt für das Verhältnis zwischen Tumorgewicht und Körpergewicht. Die Untersuchungen an gesunden Versuchspersonen wurden durchgeführt an Institutsmitarbeitern, Blutspendern und Eigenblut. Auch hierbei finden sich große Schwankungen, die klinisch keine Erklärung finden.

Die in dieser Form durchgeführten Untersuchungen nach der von TÖDT beschriebenen elektrochemischen Depolarisationsmessung können also keinen Aufschluß über den Mechanismus der Katalasehemmung geben.

Die in der Literatur beschriebenen Hemmstoffe, Toxohormone, Inhibitoren usw. sind bisher nicht exakt beschrieben und haben zunächst noch hypothetischen Charakter. Die Einflüsse auf die Fermentsysteme sind so vielseitig, daß genaue Vorstellungen in Bezug auf die

Katalase noch nicht bestehen; auch wenn GALGONE und DOMINICI (26) durch exakte Untersuchungen bei 25 Neoplasmafällen zu dem Schluß kommen, daß Katalase und Carboanhydrase vermindert und alkalische Phosphatase sowie Adenosintriphosphatase erhöht sind. Die vorliegenden Messungen unterstreichen jedoch Feststellungen (27), nach denen eine Hemmung oder Verminderung der Katalase nicht nur bei Carcinom- oder anderen Geschwulstkrankheiten auftritt, sondern auch bei Gallen- und Leberleiden, Schilddrüsenüberfunktionen, Tuberkulose, Vitamin B 1 - Mangelerscheinungen, Hypoproteinämien, hochgradigen Anaemien und anderen Erkrankungen.

C. Die Methylenblaukatalyse im menschlichen Erythrocyten

I. Anregung zu eigenen Messungen

Anlaß zur Verfolgung der Methylenblaukatalyse auf elektrochemischem Wege sind Untersuchungen von WARBURG, KUBOWITZ und CHRISTIAN (28) über die katalytische Wirkung von Methylenblau in lebenden Zellen, WARBURGs Veröffentlichungen über die Entstehung der Krebszellen (29) und die in der älteren Literatur wiederholt beschriebenen Wirkungen von Methylenblau auf die innere Atmung und das Tumorwachstum.

Zunächst sollen einige Angaben aus der Literatur über die Anwendung von Methylenblau gemacht werden.

II. Geschichtliches

Ende der siebziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurde das Methylenblau, Tetramethylthioninchlorid, ein basischer Farbstoff aus der Thiazinreihe, erstmals von CARO (30) hergestellt und von EHRLICH erstmals bei der Malaria therapeutisch angewandt. Als Stoff mit einem stark reduzierenden Potential wurde es zunächst bei Erkrankungen mit cyanotischen und dyspnoischen Erscheinungsbildern mit gutem Erfolg angewandt. Man ging dabei von der Vorstellung der gesteigerten Zellatmung durch

Methylenblau aus. So beschreibt FRANCK (31) in seinem Buch "Moderne Therapie" die Anwendung von Methylenblau bei Bronchopneumonie, Lungenödem, Emphysem und kardialer Cyanose. KALK (32) empfiehlt Methylenblau in Form einer 1%-igen Lösung zur intravenösen Applikation bei Vergiftung des Atemfermentes z.B. durch Kohlenoxyd, Cyanverbindungen und beruft sich dabei ebenfalls auf den Eingriff des Methylenblaus in die Oxydations- und Reduktionsvorgänge der Zellatmung:

Cyanionen verwandeln das für die endogene Atmung unentbehrliche katalytische Fe des Atemfermentes in eine katalytisch nicht mehr reaktionsfähige Verbindung. Dadurch wird die O_2- Übertragung von dem Hämoglobin auf die Zelle schlagartig unterbunden. Offensichtlich verwandelt Cyan das katalytische Fe in ein lockeres Fe-Ion, das so locker ist, daß zugeführtes Methylenblau eine Rückbildung zu katalytisch wirksamem Fe bewirkt.
Das Methylenblau ist also Aktivator der Atmung, da es ähnlich wie das Hämoglobin, Hämin, Methämoglobin, Hydrochinon, Pyocyanin und andere Substanzen reversibel oxydierbar und reduzierbar ist. Die atmungssteigernde Wirkung des Methylenblau fanden HARRUP und BARRON (33) zunächst in Erythrocyten, später auch in Hämoglobinfreien Zellen. WARBURG beschreibt eine Anregung der Atmung um das 20-30fache, wenn einer Kaninchenblutzellensuspension 0,2 mg Methylenblau zugesetzt werden und außerdem Glukose anwesend ist.

Im Jahre 1912 berichtet Gräfin von LINDAU (34) über ihre Erfahrungen einer Chemotherapie der Tuberkulose und brachte angeblich durch tägliche Gaben von 0,4 mg Methylenblau bei Versuchstieren tuberkulöse Abszesse durch Sklerosierung zur Ausheilung. EDELMANN und MÜLLER-DEHAM (35) berichten ebenfalls über Behandlungserfolge bei der Tuberkulose und verwandten eine Lösung aus Methylenblau und 2,4 % Argentum nitricum bei Gonorrhoe, Lymphogranulomatose, Furunkulose und Blutvergiftung. Hierbei allerdings wurde dem Methylenblau nur eine Vehikelfunktion für das Argentum zugedacht.

Im Vordergrund der Anwendungsmöglichkeiten stehen nach wie vor die Störungen der inneren Atmung (36). Das entspricht auch Feststellungen aus dem Gebiet der Botanik. PALLADIN (37), MEYERHOF (38), ROSS (39), WATANABE (40), HAYASKI (41) und andere beschäftigten sich mit dem Problem der gesteigerten Zellatmung durch Methylenblau. Bereits vor 60 Jahren wurden erstmalig therapeutische Versuche bei Carcinomträgern beschrieben. Es finden sich Veröffentlichungen aus den Jahren 1891 und 1893, in denen EINHORN (42) über Behandlungserfolge bei Ovarialtumoren nach peronaler Verabreichung von 1-3 x täglich 0,2 g Methylenblau berichtet und von D'AMBROSIO (43), der ebenfalls eine Methylenblau-Behandlung von Tumoren mit angeblich gutem Erfolg durchführte.

Weitere Ausführungen von BRAUNSTEIN (44) sind erwähnenswert. Er nahm an, daß Methylenblau im Blut zur Leukobase reduziert wird, die ihrerseits in den Zellkern eindringt, den Sauerstoff an sich reißt und damit den Untergang der Zelle bewirkt. Da eine Jod-Anreicherung in Tumorzellen beobachtet worden war, gab BRAUNSTEIN außerdem Jod. Unter dieser Behandlung wurde eine Besserung des Allgemeinzustandes und angeblich auch eine Verkleinerung der Tumoren festgestellt. ROOSEN (45) ging in seiner Carcinombehandlung von völlig anderen Gesichtspunkten aus. Er bezieht sich auf die WASSERMANNschen Versuche (46) und benutzt das Methylenblau wegen seiner Affinität zu Tumorzellen als Vehikel für Quecksilber. Bei Behandlung mit dieser Verbindung schmolzen laut Bericht Mäusetumoren ein, es kam jedoch infolge Tumorzerfalls in einigen Fällen zu Intoxikationserscheinungen. Die therapeutische Brauchbarkeit dieser Metall-Farbstoff-Verbindungen wird von GOLDMAN (47) unterstrichen. Im Jahre 1912 wird von BERNHARDT und STRAUCH (48) eine therapeutische Wirksamkeit von Methylenblau erwähnt, desgleichen von A.H. ROFFO (49) im Jahre 1932. ROFFO berichtet ausführlich über das Einschmelzen und narbige Ausheilen von ulcerierten Mamma- und anderen Hautcarcinomen. Dabei wird durch histologische Untersuchung vor und nach der Behandlung ein Beweis für die Methylenblauwirkung erbracht, indem sich die epitheliomatöse Struktur der Ulcerationen in bindegewebige umwandelt. In neuerer Zeit finden sich keinerlei Hinweise auf einen

erfolgversprechenden Behandlungsversuch mit Methylenblau.

Die Wirksamkeit eines Redoxsystems, wie es das Methylenblau darstellt, ist denkbar. Legt man WARBURGs Theorie über die Entstehung der Krebszelle zu Grunde, so müßte allerdings die geforderte Irreversibilität der Zellveränderung aufgegeben werden. WARBURG sieht als Ursache für eine maligne Entartung der Zelle ein Sauerstoffdefizit an. Dadurch kommt es zu einer irreversiblen Schädigung der Atmung, was zu einer Strukturveränderung der Zelle führt. Das heißt, die Zelle richtet sich nach längerer Zeit, nach mehreren Zellteilungen, darauf ein, ihren Energiebedarf aus der aeroben Glycolyse zu decken. Die aerobe Glycolyse spielt sich im Gegensatz zur normalen Atmung im flüssigen Protoplasma der entdifferenzierten Zelle ab. Die dabei gewonnene Adenosintriphosphorsäure ist zwar chemisch und energetisch der aus der normalen Atmung gewonnenen A T P identisch, wie diese jedoch(nach WARBURG) nicht an eine bestimmte Struktur gebunden, wie es für eine oxydative Phosphorylierung gefordert wird.

Aus diesen Tatsachen könnte gefolgert werden, daß sich eine morphologisch völlig veränderte Zelle, die sich seit mehreren Generationen auf aerobe Gärung eingestellt hat, durch Sauerstoffeinfuhr allein nicht wieder normalisieren kann.

In einer seiner neueren Arbeiten hat WARBURG Versuche beschrieben, in denen durch O_2 - Zufuhr ein signifikanter Rückgang der Glycolyse und eine entsprechende Steigerung der Atmung eintrat. WARBURG zieht hieraus den Schluß, daß die bisherige These von der absoluten Irreversibilität des Krebsgeschehens nicht mehr aufrecht zu erhalten sei.

Es muß festgestellt werden, daß nähere Aussagen zur Zeit nicht möglich sind, da Einzelheiten im Ablauf der Glycolyse noch unbekannt sind.

Zum Beispiel konnte LAMPRECHT (50) erst vor kurzem zeigen, daß die Fructose auf einem von ihm entdeckten kürzeren enzymatischen Weg gestörte Enzymsysteme umgehen kann. Es wird angenommen, daß die Glycerinaldehydphosphatdehydrase-Reaktion und nicht der Hexokinase-Umsatz eine limitierende Reaktion des glycolytischen Stoffwechsels ist. Ähnlich WARBURGs Ansicht einer "Minderwertigkeit" glycolytisch gebildeter Adenosintriphosphorsäure sind auch die Aussagen von WINDISCH und Mitarbeitern (51, 52) als kritische Betrachtung des Tumorstoffwechsels anzusehen. Ihre langjährigen Anoxybioseversuche insgesamt gewertet führen zu der Schlußfolgerung, daß beim oxy- und anoxybiotischen Zuckerabbau zwei qualitativ verschiedene Arten von dissimilatorischer Energie entstehen, von denen die oxydativ gebildete als biologisch wirksam gekennzeichnet ist.

Wieder neue Gesichtspunkte zeichneten sich ab, als von WINDISCH und Mitarbeitern (53, 54) bei näherer Untersuchung der anabiotischen Zellreaktionen ein bisher noch unbekannter anoxygener Energieprozeß ausfindig gemacht werden konnte, der im Gegensatz zu Gärung und Glycolyse biosynthetisch außerordentlich funktionsfähig ist. Diesen im einzelnen noch nicht näher beschriebenen Weg konnte WINDISCH durch 2,4-Dinitrophenol reversibel hemmen, wobei dem Dinitrophenol ebenso wie dem Methylenblau eine Entkopplungswirkung auf die Atmung zugeschrieben wird.

Bei Kaninchenmitochondrien, deren Atmung durch 0,02 M Guanidin auf 1/3 bis 1/6 herabgesetzt war, wurde nach Acta Pharmacologica et Toxicologica (55) bei Zugabe von Dinitrophenol und Methylenblau ein sehr unterschiedliches Verhalten festgestellt. Durch Nitrophenolzusätze in einer Konzentration, welche die Sauerstoffaufnahme bei Guanidinzugabe auf normale Werte erhöhte, erfolgte eine vollständige Blockierung bzw. Entkopplung der Phosphorylierung. Bei Methylenblau-Zusatz dagegen wurde zwar in der gleichen Weise die Normalisierung des Sauerstoffverbrauches wiederhergestellt, aber die Phosphorylierung wurde gegenüber dem Kontrollversuch ohne Methylenblau sogar auf fast das Doppelte erhöht und erreicht damit 60% der ohne Guanidin oder Antimycin stattfindenden Phosphorylierung. Es wird hierbei der folgende

Mechanismus der Methylenblau-Wirkung angenommen: Die zwischen den Flavoproteinen und dem Cytochromsystem durch Guanidin oder Antimycin blockierte Atmungskette wird dadurch wieder in Gang gebracht, daß Methylenblau vom Flavoprotein Elektronen aufnimmt und das so entstandene Leukomethylenblau durch das Cytochromsystem (Cytochromoxydase) wieder in Methylenblau zurückoxydiert wird. Für eine Gesamtbeurteilung der Methylenblauwirkung ist noch das Verhalten bei Unterbindung der Gewebsatmung beispielsweise durch KCN von Bedeutung. Fügt man zu derart vergifteten Zellen Methylenblau hinzu, so wird die Atmung weitgehend wiederhergestellt, denn der Farbstoff kann von den nicht gehemmten Dehydrasesystemen der Zellen reduziert und von molekularem Sauerstoff direkt reoxydiert werden, so daß die Mitwirkung einer Oxydase an der Atmung nicht mehr erforderlich ist (56).

Hiernach ist also Methylenblau in der Lage, die Wirkung der beim Krebsgewebe auf etwa den fünften Teil abgesunkenen Cytochromoxydase zu ersetzen. Jedenfalls ist die beobachtete günstige Methylenblau-Wirkung biochemisch durchaus verständlich, auch wenn dem Methylenblau ebenso wie dem Nitrophenol eine "Entkopplungswirkung" auf die Atmung und Phosphorylierung zugeschrieben wird.

In Anbetracht der sehr umstrittenen Vorgänge erschien es von Interesse, noch einmal auf die älteren Untersuchungen einzugehen. Wie bereits erwähnt, haben

BARRON und HARRUP schon 1928 die atmungssteigernde Wirkung von Methylenblau auf Erythrocyten in Gegenwart von Glucose entdeckt. Sie haben gezeigt, daß unter den Endprodukten der Verbrennung Kohlensäure auftritt, und daß die "Methylenblauatmung" narkotisierbar ist wie die normale Atmung, was durch Untersuchungen von anderer Seite bestätigt werden konnte. Nach den WARBURGschen Befunden findet bei 0,005% Methylenblauzusatz beim Schütteln mit 80 % CO und 20 % O_2 keine Vergiftung statt, dagegen bei 0,0005% Methylenblau eine 80%ige Kohlenoxydhemmung der Methylenblaukatalyse. Damit ist durch den WARBURGschen in vitro-Versuch eine Grenzkonzentration an Methylenblau gegeben, welche gerade noch ausreicht, um eine Vergiftung zu verhindern. Überträgt man diese Grenzkonzentration auf 5 Liter Blut, so erhält man 250 mg. Das ist aber gerade diejenige Menge, welche im Mittel für einen therapeutischen Zusatz von Methylenblau zur Beseitigung von Vergiftungen der Atmung in der Literatur angegeben wird.

Diese Angaben beziehen sich auf Vergiftungen durch CO, KCN, Methämoglobinämie, Cyanosen, aber auch bei Schäden der inneren Atmung allgemein und auch für Tumorerkrankungen. Bei seit 1 1/2 Jahren laufenden klinischen Versuchen mit einer aus Zugaben von Methylenblau, Vitamin C und Laevulose bestehenden Krebstherapie wird nach den neuesten Erfahrungen auch

annähernd dieselbe Methylenblaumenge, nämlich 200 mg als wirksam gegeben, ohne daß hierbei auch über lange Behandlungszeiten irgendwelche schädlichen Nebenwirkungen beobachtet werden konnten. WARBURG, KUBOWITZ und CHRISTIAN untersuchten den Vorgang der Methylenblauatmung in größeren Versuchsreihen. Diese Arbeiten führten zur Entdeckung der wasserstoffübertragenden Fermente.

Nach WARBURG spielen sich bei der Katalyse folgende Reaktionen ab:

1. Methylenblau + Hämoglobin + Wasser = Leukomethylenblau + Methämoglobin.
2. Methämoglobin + Kohlenhydrat = Hämoglobin + Kohlenhydratoxydationsprodukte.
3. Leukomethylenblau + Sauerstoff = Methylenblau + Wasser.

Aus dieser Gleichung ergibt sich, daß das Methylenblau nicht die organische Substanz oxydiert, sondern das 2-wertige Eisen des Hämoglobins zum 3-wertigen des Methämoglobins. Letzteres oxydiert die organische Substanz. Hierbei wird das gesamte Methylenblau zu Leukomethylenblau umgewandelt, welches durch Sauerstoff wieder zu Methylenblau reoxydiert wird. Auf diese Weise tritt zu dem Sauerstoffverbrauch der normalen Atmung der Verbrauch für die Methylenblauatmung. Das heißt: Methylenblau steigert die Atmung. Seinem Mechanismus

nach, der Oxydation der organischen Substanz durch Hämineisen, ist dieser Vorgang der normalen Atmung nach WARBURG sehr ähnlich.

Aufgabe der folgenden Untersuchungen ist es, die Atmung von menschlichen Erythrocyten bei Methylenblaukatalyse im Sinne WARBURGs durch elektrochemische Sauerstoffmessungen zu reproduzieren. Es soll außerdem festgestellt werden, ob sich Unterschiede in der Atembeschleunigung zwischen den Erythrocyten Gesunder und Krebskranker finden.

III. Eigene Untersuchungen

1. Methodik

Die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs bei der Methylenblaukatalyse geschieht wiederum auf elektrochemischem Wege. Man entnimmt mit 3,8 %-igem Natriumcitrat ungerinnbar gemachtes Venenblut und wäscht dieses durch mehrmaliges vorsichtiges Zentrifugieren mit physiologischer Kochsalzlösung und nachträglichem Absaugen. Die abzentrifugierte Serummenge wird durch Pufferlösung ersetzt. Die Pufferlösung besteht aus :

8,5 Vol m/2 $Na_2 HPO_4$ + 1,5 Vol m/2 KH_2PO_4,
mit physiologischer Kochsalzlösung auf das
25-fache verdünnt.

Die Erythrocytensuspension wird in ein Wasserbad von 37 ^{o} C gestellt und dient als Stammlösung für die folgenden Zusätze. Zu 5 ccm der Erythrocytensuspension wird 1 ccm einer frisch bereiteten Lösung aus 1 g Glucose + 2,5 mg Methylenblau, mit der oben beschriebenen Pufferlösung auf 100 ccm aufgefüllt, gegeben. Das entspricht einer Menge von

0,005 mg Methylenblau + 2 mg Glukose

pro 1 ccm Blut. Die elektrochemische Messung der Methylenblaukatalyse erfolgt hier also mit dem 10-ten Teil der von WARBURG, CHRISTIAN und KUBOWITZ benutzten Methylenblaukonzentration, da sich hierbei exaktere Meßergebnisse fanden.

Zur Messung selbst dient ein Elektrodengefäß von 100 ccm Inhalt. Als Elektrolytflüssigkeit wurde n/10 HCL verwandt. Als Kathode dient eine amalgamierte Goldelektrode und als Anode Zink in gesättigter KCL hinter einem Diaphragma. Gemessen wird hierbei der vom Hämoglobin abgespaltene Sauerstoff. Das Hämoglobin kann pro Eisen-Atom 1 Mol O_2 addieren. Da es 4 Fe-Atome enthält, bindet es 4 Mol Sauerstoff. Es entsteht Oxyhämoglobin (Hb O_2). Durch Einwirkung von Oxydationsmitteln wird im Verbande des Hämoglobins der Häm-Anteil zum Hämin oxydiert; dieses "Parahämatin" kann nur noch eine OH-Gruppe binden (entsprechend der Bildung des Oxyhämins). Diese Verbindung heißt Methämoglobin. Durch die 4 OH-Gruppen wird also die Hälfte des vorhandenen O_2

festgehalten, und man kann nur die 2 abgespaltenen O_2-Mol in der Lösung erwarten, was bei der Berechnung des tatsächlichen O_2-Gehaltes berücksichtigt werden muß.

Durch Einleiten von Stickstoff in das luftdicht verschlossene Elektrodengefäß wird Sauerstoffarmut, respektive Sauerstoffreiheit erzielt. Für raschen Konzentrationsausgleich sorgt ein mit 800 Umdrehungen pro Minute laufender Magnetrührer. Die Eichung erfolgt durch Zugabe von jeweils 1 ccm luftgesättigter (sauerstoffgesättigter) Elektrolytflüssigkeit. Die Luftsättigung wird durch Einleiten von Luft mittels einer Aquarienluftpumpe in ein gesondertes Gefäß im Wasserbad erreicht.

Nach Zugabe der Erythrocyten-Methylenblau-Glukose-Suspension kommt es zu weiterem Stromanstieg, der dem Freiwerden des Sauerstoffs aus dem Hämoglobin entspricht. Die Messungen erfolgen sofort, 1 und 2 Stunden nach Ansatz der Erythrocyten-Methylenblau-Glukose-Suspension. Der Unterschied der elektrochemischen Messung gegenüber der WARBURG-Methode ist folgender:

WARBURG stellt den Sauerstoffverbrauch durch Ermittlung der Druckabnahme in der Gasphase fest, wobei der Sauerstoffaustausch zwischen Flüssigkeitsphase und Gasphase durch Schütteln bewirkt wird. Bei der elektrochemischen Messung findet der Sauerstoffverbrauch in ruhender Lösung statt. Der Sauerstoff wird dabei direkt aus der Lösung entnommen und aus dem Oxyhämoglobin des Blutes nachgeliefert. Aus den WARBURGschen Ergebnissen läßt sich er-

rechnen, wie lange der Oxyhämoglobinvorrat den Sauerstoffbedarf decken kann. WARBURG findet bei Menschenblut pro Stunde und ml Zellen etwa 45 mm^3 = 63 Mikrogramm Sauerstoff. Da 1 ml Blut etwa 300 Mikrogramm Sauerstoff als Oxyhämoglobin binden kann, würde der Oxyhämoglobingehalt bei 100 % Hämoglobin und 100 % Sauerstoffbindung nicht ganz 5 Stunden ausreichen. Hierbei ist vorausgesetzt, daß der Vorgang in ruhender Lösung mit der gleichen Geschwindigkeit verläuft, wie bei den Schüttelversuchen von WARBURG und daß die Nachlieferung von Sauerstoff schnell genug verläuft. Denn der Sauerstoffvorrat in der mit den Erythrocyten gemischten Pufferlösung beträgt bei einem mittleren Oxyhämoglobingehalt nur etwa 1 Mikrogramm pro ml und sinkt dann annähernd direkt proportional mit abnehmendem Oxyhämoglobingehalt weiter ab.

Es wurde nun beobachtet, daß die elektrochemisch festgestellten Werte des Sauerstoffverbrauchs den WARBURGschen Ergebnissen entsprechen und daß die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs auch dann noch dieselbe bleibt, wenn 90 - 95 % des Oxyhämoglobins verbraucht sind. Da 1 ml Blut pro Minute etwa 1 Mikrogramm Sauerstoff verbraucht, müßte bei etwa 15 Mikrogramm gebundenem Sauerstoff pro ml Blut der Vorrat der Flüssigkeitsphase in ca. 3 Sekunden erschöpft sein. Da aber auch bei diesem geringen Gehalt an gebundenem Sauerstoff noch keine Verzögerung des Sauerstoffverbrauchs vorhanden

war, muß sich das Gleichgewicht zwischen Oxyhämoglobin und dem in der die Erythrocyten umgebenden Pufferlösung gelösten Sauerstoff in etwa 1 Sekunde oder schneller eingestellt haben.

2. Versuchspersonen und Versuchsergebnisse

Es wurden die Erythrocyten von 22 gesunden Versuchspersonen (Institutsangestellte und Blutspender) und von folgenden Carcinompatienten getestet:

1) ausgedehntes Genital-Ca
2) ausgedehntes Genital-Ca
3) Rectum-Ca
4) Rectum-Ca
5) Magen-Ca
6) Magen-Ca
7) Bronchial-Ca
8) Struma maligna
9) metastasierendes Kehlkopf-Ca
10) Mamma-Ca
11) Corpuscarcinom des Uterus
12) Malignom ?
13) Oesophagus-Ca
14) Oesophagus-Ca
15) Mamma-Ca
16) Plattenepithel-Ca
17) Bronchial-Ca
18) Plattenepithel-Ca, Thoraxmetastasen
19) Zungen-Ca.

In Tabelle 1 und 2 sind die errechneten γ-Werte für den Sauerstoff zusammengestellt. Und zwar für sofort, 1 Stunde und 2 Stunden nach Ansatz der Lösung.

Tabelle 1 : Ca - Patienten

	sofort	1 Std.	2 Std.	Diff.	
1	161	23	9,1	(152)	Mastdarm-Ca
2	177	122	60	(117)	" "
3	152	85	21	(131)	Bronchial-Ca
4	200	94	11,5	(188)	Struma maligna
5	134	110	83	(51)	Kehlkopf-Ca, Metastasen
6	87,5	53	43,7	(44)	Mamma-Ca
7	101	57,5	27,6	(74)	Malignom
8	97	80,5	53	(43)	Oesophagus-Ca
9	166	136	108	(58)	" "
10	136	122	81	(55)	Mamma-Ca
11	170	138	108	(62)	Plattenepithel-Ca
12	110	80,5	43,7	(66)	Bronchial-Neopl.
13	50,5	34,5	18,4	(32)	Plattenepithel-Ca
14	85	50,7	16	(70)	Zungen-Ca

Tabelle 2 : G e s u n d e

	sofort	1 Std.	2 Std.	Diff.
15	78	73,5	73,5	(4,5)
16	46	34,5	23	(23)
19	145	69	11,5	(134)
20	83	60	27,5	(57)
21	180	92	18,4	(170)
22	177	115	57,5	(120)
23	191	136	60	(131)
24	244	152	67	(177)
28	152	78	30	(132)
30	120	90	41,5	(79)
31	110	39	2,3	(108)
32	73,5	25,4	0	
33	96,7	55	27,5	(70)
34	156	78	60	(94)
35	142	55	18,4	(126)
36	92	55	32,2	(60)
37	99	69	41,5	(48)
38	62	34,5	23	(39)
39	90	78	55	(35)
40	76	41,5	21,5	(55)
41	96,5	46	16	(80)
42	115	78	43,7	(87)
43	102	64,5	30	(72)
44	76	48,4	23	(53)
45	76	37	9,2	(67)
46	69	32,2	4,6	(64)
47	85	48,4	18,4	(67)

Die angegebenen γ-Werte für den Sauerstoffgehalt wurden durch jeweils einmalige Messung ermittelt.

Reihenuntersuchungen mit jeweils 1 ccm Blut aus einer Gesamtmenge von 16 ccm arterialisiertem Blut ergaben Werte zwischen 255 und 259 γ O_2.

3. Diskussion der Ergebnisse

Allein die oberflächliche Betrachtung der Versuchsergebnisse läßt erkennen, daß eine sehr weite Streuung der absoluten Sauerstoffmengen von 60 bis über 200 γ vorliegt. Die normalerweise zu erwartenden venösen Sauerstoffwerte von ca. 150 γ O_2 werden also in vielen Fällen nicht erreicht, in anderen wesentlich überschritten. Eine gewisse Streuung von ca. 20-30 γ O_2 war zu erwarten, da die Versuchspersonen in unterschiedlicher Abstauungszeit der Vene vor der Blutentnahme, unterschiedlichen Hb-Werten und anderen nicht näher zu beschreibenden Faktoren nicht konstante Versuchsbedingungen boten. Damit sind allerdings die sehr hohen Schwankungen nicht erklärbar. Aus den angegebenen Zahlenquoten läßt sich zwar eine Tendenz zu durchschnittlich geringerem Sauerstoffverbrauch der Carcinompatienten ablesen, jedoch ist keine Gegenüberstellung typisch Gesunder und typisch Kranker möglich. Das heißt, eine diagnostische Bewertung ist völlig unmöglich. Im großen und ganzen verläuft die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs während der zweistündigen Beobachtungszeit gleichmäßig. Man sieht indessen, daß in einigen Fällen die Geschwindigkeiten entweder während der ersten oder

zweiten Stunde größer sind. Ungefähr, kann man nur sagen, bringt die elektrochemische Methode die gleichen Werte für die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs der Erythrocyten durch Methylenblau-Glukose-Zusatz, wie sie von WARBURG gefunden wurden.
Eine Veränderung der Methylenblaukatalyse im Erythrocyten von Krebskranken ist jedoch mit der elektrochemischen Meßmethode nicht festgestellt worden.

Diese Schlußfolgerung entspricht Feststellungen von ERIKSEN, ELLERBROCK und LIPPINOTT (57), die die Methylenblaureduktion im Plasma Gesunder und Krebskranker testeten, sowie der Bestätigung durch HILL und MULFORD (58), die bei Verfolgung der Methylenblaureduktion ebenfalls diagnostisch nicht verwertbare Ergebnisse erhielten.

D. Zusammenfassung

Bei gesunden und krebskranken Versuchspersonen werden die Katalaseaktivität und Methylenblauatmung der Erythrocyten bestimmt. Es wird die elektrochemische Meßmethode nach F. TÖDT verwandt, die auf der Bestimmung eines Diffusionsgrenzstromes beruht.

Konzentrationsänderungen oxydierender oder reduzierender Substanzen werden mittels geeignet zusammengestellter galvanischer Elemente gemessen. Der primäre Vorgang besteht darin, daß sich das unedlere Metall des galvanischen Elementes unter Bildung von Metallionen auflöst und die hierbei freigewordenen Elektronen an der edleren Elektrode den Sauerstoff reduzieren. Für die Praxis ist es dabei von Wichtigkeit, daß zwischen dem elektrochemischen Sauerstoffumsatz und der gemessenen Stromstärke eine reproduzierbare Beziehung besteht.

Seit Jahrzehnten werden sogenannte Hemmfaktoren, Toxohormone bzw. Inhibitoren für Zusammenhänge zwischen Tumorerkrankungen und verminderter Katalaseaktivität verantwortlich gemacht, ohne daß eine genaue Analysierung dieser Substanzen gelang.

In der vorliegenden Arbeit lassen sich bei Reihenuntersuchungen an 27 gesunden und 31 vorwiegend krebskranken Versuchspersonen keine eindeutigen Unterschiede mit der

elektrochemischen H_2O_2-Meßmethode ermitteln, so daß Vorstellungen eines gestörten Katalase-Peroxyd-Gleichgewichtes bei Carcinomträgern auf diesem Wege nicht objektiviert werden können.

Unter Zugrundelegung der WARBURGschen Theorie der Krebszellenentstehung wird an weiteren 22 gesunden und 19 krebskranken Versuchspersonen die Methylenblaukatalyse im menschlichen Erythrocyten gemessen.

Hierbei finden sich bei Anwendung der von F. TÖDT beschriebenen Methode der elektrochemischen Sauerstoffmessung ebenfalls keine verwertbaren Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Dieses Ergebnis entspricht Befunden von ERIKSEN und HILL, die die Methylenblaureduktion im Blutplasma Gesunder und Krebskranker untersuchten und ebenfalls diagnostisch verwertbare Unterschiede nicht erheben konnten.

Literatur

(1) TÖDT, F. : Elektrochemische Sauerstoffmessungen.
Verlag Walter de Gruyter & Co, Berlin (1958)

(2) DAMASCHKE, K. u. D.WINKELMANN : Elektrochemische H_2O_2-Messung und ihre Anwendung beim Zerfall von H_2O_2 durch Katalase.
Zeitschrift für Naturforschung 2, 85-89 (1956)

(3) DAMASCHKE, K.u. F. TÖDT : Anwendung der elektrochemischen H_2O_2 - Messung auf die Verfolgung des katalysierten Zerfalls von H_2O_2 durch Blutkatalase.
Zeitschrift f. Naturforschung 11, 621-624 (1956)

(4) HIRSCH, H.H. u. W. PFÜTZER : Über die Ultrafiltrierbarkeit des Katalase-hemmfaktors aus Ehrlichschem Mäuseascites-tumor.
Zeitschrift f. Krebsforschung 60, 609-615 (1955)

(5) GREENSTEIN, J.P. : Titration of the liver catalase activity of normal and of tumor bearing rats and mice.
Journal of National Cancer Institute, 2, 525 (1942)

(6) FUKUOKA, F. u. W. NAKAHARA : Mode of Action of Toxohormone. Gann. (The Japanese Journal of cancer Research) 42, 55-67 (1951)

NAKAHARA,W. u. F. FUKUOKA : Toxohormone, a characteristic toxic substance produced by cancer tissue Gann 40, 45 (1949)

(7) GREENSTEIN, J.P. and H.R. ANDERVONT: The liver catalase activity of tumor bearing mice and the effect of spontaneous regression and of removal of certain tumors.
Journal of the National Cancer Institute 2, 345 (1942)

(8) FRISCH-NIGGEMEYER,W. u. H. HÖLLER : Der Einfluß von Tumorkochsaft auf die Aktivität der Leukocytenkatalase.
Zeitschrift f. Krebsforschung 60, 291-293 (1955)

(9) v.EULER, H., L.AHLSTRÖM, J. RÖNNESTAMM u.J.PETTERSSON : Über den Brenztraubensäuregehalt im Blut tumortragender Ratten und Mäuse.
Zeitschrift f. Krebsforschung 55, 15-25 (1944)

(10) v.EULER,H.u.L.Heller: Katalaseaktivität in Leberfraktionen normaler und sarkomtragender Ratten.
Zeitschrift f. Krebsforschung 56, 393-406 (1949)

(11) GREENSTEIN,J.P. u. H.R. ANDERVONT : zitiert nach (10)

(12) GREENSTEIN,J.P., W.V. JENRETTE und J.WHITE : The liver catalase activity of tumor bearing rats and the effect of extirpation of the tumor.
Journal of National Cancer Institute 2, 283 (1941)

(13) HADDOW, A. : The Biochemistry of Cancer.
Annual Review of Biochemistry 24, 689-742 (1955)

(14) APPLEMAN : zitiert nach: KENSLER, Ch.J. u. M.L. PETERMANN:
The Chemistry of Neoplastic Tissue.
Annual Review of Biochemistry 22, 319-340 (1953)

(15) DUTCHER, R.A. und A. COLLATZ : zitiert nach (10)

(16) DRAGANESCO, St. und A.L.DRAGANESCO : Quelques Recherches sur les Ferments des Tissus chez le Pigeon normal et en Avitaminose.
Comptes Rendus de la Société de Biologie. 1, 1470-1472 (1925)

(17) PAPADODOULOU,D. : The Blood Catalase Activity in Normal and Cancer Individuals. Factors influencing its Activity.
Zeitschr. Oncologia 6 (1953)

(18) v. EULER, H. und K. JOSEPHSON : Bezeichnung der Aktivität und Affinität von Enzymen.
Berichte d. Deutschen Chemischen Gesellschaft 56, 1749-1758 (1923)

(19) BURGE : zitiert nach (18)

(20) KÜNSTLER, W.E. : Über die Verwendungsfähigkeit der osmotischen Resistenzbestimmung von Erythrocyten bei der Diagnose bösartiger Geschwülste.
Folia haematologica (Leipzig) 49, 21-50 (1933)

(21) MITROVITCH : zitiert nach (3)

(22) KRAINEW, J. : zitiert nach (3)

(23) CASTRILLO, P. : Contenido en catalase de los leucocitos de enfermos cancerosos.
Acta cientifica Venezolano 6/5-6, 210-212 (1955)

(24) HOLMAN, R.A. : A method of destroying a malignant rat tumour in vivo.
Nature (London) 179, 4568 (1957)

(25) HOLMAN, R.A. : Production of Abnormal Bacteria, possible Analogies with Formation of tumours.
Lancet 2, 515 (1956)

(26) GALCONE A. u. L. DOMINICI : Untersuchungen über Enzymveränderungen in Erythrocyten und Plasma bei Carcinomträgern. (Übersetzt)
Medicina (Parma) 5/1, 59-84 (1955)

(27) TAVARES, R. : Studies on a catalase-inhibitor in the Plasma of cancer and non cancer patients.
Revista medica (Chile) 83, 1955

(28) WARBURG, O., F.KUBOWITZ u. W.CHRISTIAN: Über die katalytische Wirkung von Methylenblau in lebenden Zellen.
Biochemische Zeitschrift 227, 245-271 (1930)

(29) WARBURG, O.: Über die Entstehung der Krebszellen.
Die Naturwissenschaften 42, 401-406 (1955)

(30) HAGER, H. : Handbuch der pharmazeutischen Praxis für Apotheker, Ärzte, Drogisten und Medizinalbeamte.
Verlag Springer, Berlin, Bd. 1, 460 (1927)

(31) FRANCK, R. : Moderne Therapie.
Schlüter-Verlag, Hannover (1955)

(32) KALK, Heinz : Die Therapie an den Berliner Universitäts-Kliniken.
2. Bd., 654 (1945)
Verlag Urban & Schwarzenberg, Berlin u. Wien

(33) HARRUP, G.A., E.S. GUZMAN u.BARRON: Studies on Blood Cell Metabolism.
Journal of experimental Medicine 48, 207-223 (1928)

(34) Gräfin von LINDEN : Weitere Erfahrungen mit einer Chemotherapie der Tuberkulose.
Münchner Medizinische Wochenschrift 59, 2560-63 (1912)

(35) EDELMANN u. M.DEHAM: Neue therapeutische Versuche bei allgemeinen und lokalen Infektionen.
Deutsche Medizinische Wochenschrift 39, 2292 (1913)

(36) ALY, F. : Behandlung einer schweren Cyannatriumvergiftung mit Methylenblau und Katalysin.
Ärztliche Wochenschrift 12, 1014 (1957)

(37) PALLADIN, W. : Über die Wirkung von Methylenblau auf die Atmung und alkoholische Gärung lebender und abgetöteter Pflanzen.
Berichte d. Deutschen Botanischen Gesellschaft 29, 472 (1911)

(38) MEYERHOF, O. : Über die scheinbare Atmung abgetöteter Zellen durch Farbstoffreaktionen.
Pflüger's Archiv 149, 250 (1913)

(39) ROSS, E. : The effects of sodium cyanide and methylene blue on oxygen consumption by Nitella clavata.
Americ. J. Bot. 25, 458 (1938)

(40) WATANABE, A. : Über die Beeinflussung der Atmung von einigen grünen Algen durch Kalium-cyanid und Methylenblau.
Acta Phytochimica 6, 315 (1932)

(41) HAYASKI, J. : Über die Bedeutung der Farbstoffe, besonders der farbstoffspeichernden Granula im Gewebsatmungssystem.

Acta Scholae med. Univ. imp. Kioto 22, 163 (1938)

(42) EINHORN, M. : Über die Anwendung des Methylenblau bei Cystitis, Pyelitis und Carcinom.

Dt. Med. Wochenschrift 18, 620 (1891)

(43) D'AMBROSIO : Über einen günstig verlaufenen Fall von Mamma-Carcinom nach Anwendung von Methylenblau.

Münchner Medizinische Wochenschrift 33, 634 (1893)

(44) BRAUNSTEIN, A. : Chemotherapeutische Versuche an Krebskranken mittels Selenjodmethylenblau.

Berliner Klinische Wochenschrift 24, 1102-1104 (1913)

(45) ROOSEN : Zum Problem der inneren Desinfektion.

Dt. Medizinische Wochenschrift 40, 481-482 (1914)

(46) v.WASSERMANN, A. u. Fr. KEYSSER : Beiträge zum Problem: Geschwülste von der Blutbahn aus therapeutisch zu beeinflussen.

Dt. Medizinische Wochenschrift 51, 389-91 (1911)

(47) GOLDMANN, D. : Vitale Färbung und Chemotherapie.

Berliner Klinische Wochenschrift 36, 1689-94 (1912)

(48) BERNHARD ,H. u. C.B. STRAUCH : Zur Behandlung inoperabler Tumoren mit Isaminblau.

Zeitschrift für Krebsforschung 26, 361 (1928)

(49) ROFFO, A.H. : Oxydo-Reduktion in der Krebsbehandlung.

Zeitschrift für Krebsforschung 37, 1 (1932)

(50) LAMPRECHT, W. u. J. TRAUTSCHOLD : Nachweis eines direkten Insulineffektes auf den Kohlehydratstoffwechsel der Leber.

Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie 311, 245-255 (1958)

(51) WINDISCH, F.H.Haehn, W. HEUMANN : Qualitative Differenzierung des Atmungs- und Spaltungsstoffwechsels auf Grund des mycetischen Proliferationstestes.
Arch. Geschwulstf. 6, 64 (1953)

(52) WINDISCH, F. : Cytochemische Untersuchungen über den Zusammenhang von nativer Gärungsintensität und desoxygenem Energiepotential beim anoxybiotischen Phosphatstoffwechsel.
Arch. f. Mikrobiol. 26, 273 (1957)

(53) WINDISCH, F. : Endergonic reactions of encymes in dependence of the anaerobic energy-potential.
Proc. of Internat. Symposium on Encym Chemistry, Tokio 1957, London: Pergamon Press 1958

(54) WINDISCH, F. : Über einen bisher unbekannten Proceß der anoxygenen Energiebildung in Krebszellen.
Vortrag Berl. Physiol. Gesellschaft, Klin. Wochenschrift 7, 423-33 (1958)

(55) HOLLUNGER, G. : Effect of methylene blue on the oxygen and phosphate uptake of guanidine inhibited mitochondria.
Acta Pharmacologica et Toxicologica Vol. 11, Suppl. 1, chapter X, S.68-80, 1955

(56) BALDWIN, E. : "Biochemie".
Verlag Chemie G.m.b.H. S.120 (1957)

(57) ERIKSEN, N.L., L.ELLERBROOK, St. LIPPINCOTT.: The Reduction of Methylenblue by Plasma.
Canc. Res. 215 (1950)

(58) HILL, St. u. MULFORD : An elevation of four cancer serodiagnostic tests.
Cancer (Philadelphia) 5/1, 13-23 (1952)

Mein besonderer Dank gilt Herrn
Professor Dr. med. B. S c h m i d t
für die freundliche Überlassung
des Themas, die Vermittlung der
Versuchspersonen und Patienten
sowie die Arbeitsmöglichkeit im
Hygienischen Institut.

Gleichzeitig gilt mein Dank Herrn
Professor Dr.-Ing. F. T ö d t
für die zur Verfügungstellung der
Meßinstrumente und die praktischen Rat-
schläge für die technische Durchfüh-
rung der Versuchsreihen.

Horst Teichmann
Berlin - Dahlem, Föhrenweg 14

L e b e n s l a u f

Am 2o.Januar 1932 wurde ich als Sohn des Oberingenieurs Bruno Teichmann und seiner Ehefrau Hedwig geb.Heising in Berlin geboren.

Die Kinderjahre verlebte ich in Berlin, wo auch die Grundschule besucht wurde. Im Jahr 194o verstarb mein Vater im Verlauf einer Diphtherie. In den Jahren von 1943 bis 1945 lebte ich als Internatsschüler in dem Zinzendorf-Pädagogium der Brüdergemeine in Niesky. Von hier aus flüchtete meine Mutter mit meiner Schwester und mir zu Anfang des Jahres 1945 nach Witzenhausen an der Werra. Die weitere Oberschulausbildung erfolgte in Hannoversch-Münden. Ostern 1946 kehrte die Familie nach Berlin zurück, wo ich bis zum Abitur am 16. Juni 1949 die Leibniz-Schule in Berlin SW-29 besuchte.

Im Anschluss daran absolvierte ich das Krankenpflegepraktikum im St.-Gertrauden Krankenhaus, Berlin-Wilmersdorf, und arbeitete im diagnostischen Laboratorium des Studentenarztes der Freien Universität in Berlin-Dahlem.

Wegen noch nicht erfolgter Zulassung für das Studium der Humanmedizin wurde die Folgezeit durch den Besuch eines Sonderlehrganges für Abiturienten an der Städtischen Wirtschaftsschule in Berlin-Wilmersdorf und den Beginn einer kaufmännischen Lehre bei der Schering A.G. überbrückt.

Vor Abschluss der Lehre wurde ich zum medizinischen Studium an der Freien Universität zugelassen und am 22.Oktober 1951 feierlich immatrikuliert. Am 24.Juli 1954 bestand ich das Physikum mit dem Gesamturteil gut. Auch die klinischen Semester habe ich an der Freien Universität Berlin gehört. Zum Zwecke der Famulatur besuchte ich das Städtische Rudolf-Virchow-Krankenhaus und das Allgemeine Krankenhaus in Bar, Montenegro.

Nach Ablegung des Staatsexamens am 13.Januar 1958 wurde ich als Medizinalassistent im Städtischen Krankenhaus Moabit eingestellt. Hier erhielt ich meine weitere Ausbildung auf der chirurgischen, gynäkologischen, pädiatrischen und internen Abteilung.

Seit der Bestallung als Arzt am 2. März 196o bin ich in diesem Haus als Stationsarzt auf der I.Inneren Abteilung.

Horst Teichmann